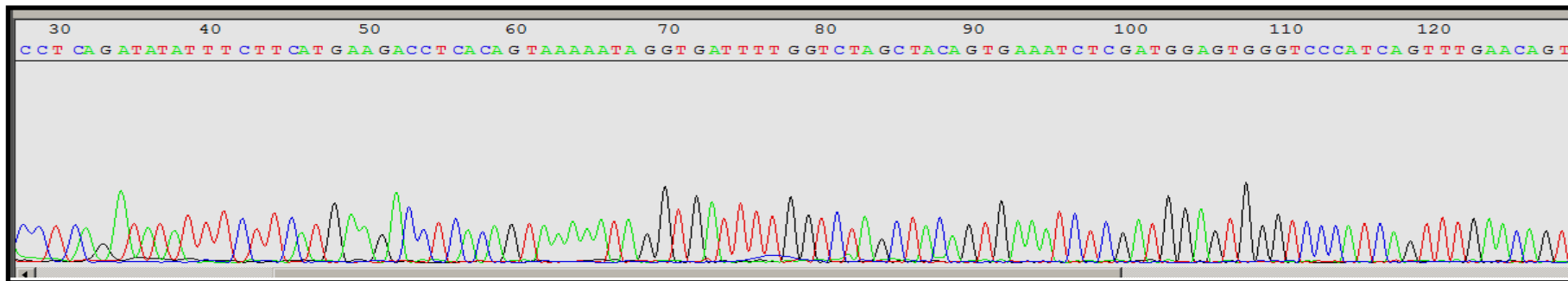


**33. MORPHOLOGIE-  
HISTOLOGIE TAGE**

15. – 16. Oktober 2010  
Kongress Palais Kassel – Stadthalle

# Tipps und Tricks - Fehlersuche in der Pathologie bei der Mutationsanalytik



Anja Schöpflin

Institut für Pathologie

Universitätsklinikum Freiburg





## Überblick:

---



**33. MORPHOLOGIE-  
HISTOLOGIE TAGE**

15. – 16. Oktober 2010  
Kongress Palais Kassel – Stadthalle

- Was versteht man unter Mutationsanalytik?
- Sequenzierung nach Frederick Sanger
  - Prinzip der Methode
  - Beispiele für Sequenzauswertungen
- Validierung der Ergebnisse
  - Fehlersuche
  - Tipps und Tricks



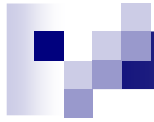
**33. MORPHOLOGIE-  
HISTOLOGIE TAGE**

15. – 16. Oktober 2010  
Kongress Palais Kassel – Stadthalle

## Was versteht man unter Mutationsanalytik?

### Mutationen:

- spontan und zufällig auftretende Veränderungen in der DNA
- können einzelne Nukleotide, oder auch Teile von Chromosomen bzw. ganze Chromosomen betreffen



**33. MORPHOLOGIE-  
HISTOLOGIE TAGE**  
15. – 16. Oktober 2010  
Kongress Palais Kassel – Stadthalle

## Was versteht man unter Mutationsanalytik?

### Mutationsanalysen:

- immer höheren Stellenwert in der täglichen molekularpathologischen Diagnostik
- ermöglicht genauere Klassifikation von Tumoren verschiedener Organsysteme:  
z.B. Lunge, Gastrointestinaltrakt
- relevant für viele Therapieentscheidungen:  
z.B. EGFR, K-ras, B-raf, c-Kit



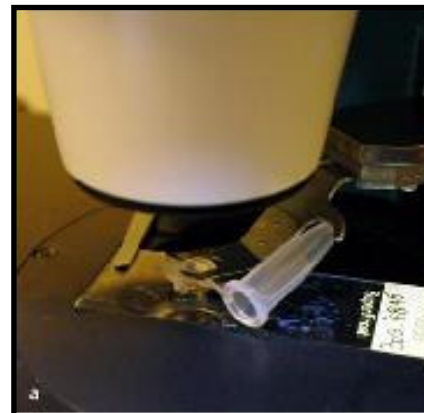
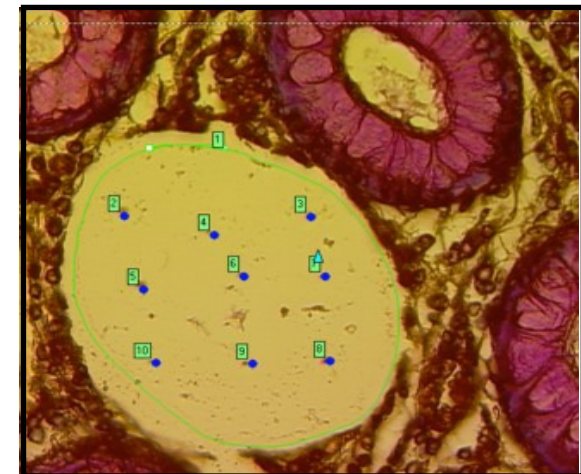
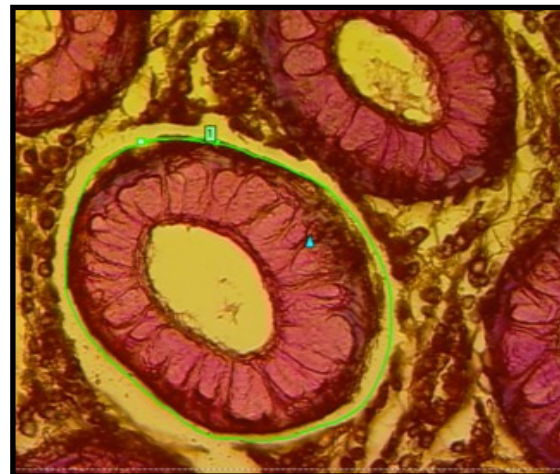
Probenvorbereitung:



**33. MORPHOLOGIE-  
HISTOLOGIE TAGE**

15. – 16. Oktober 2010  
Kongress Palais Kassel – Stadthalle

Laser-Mikrodissektion:





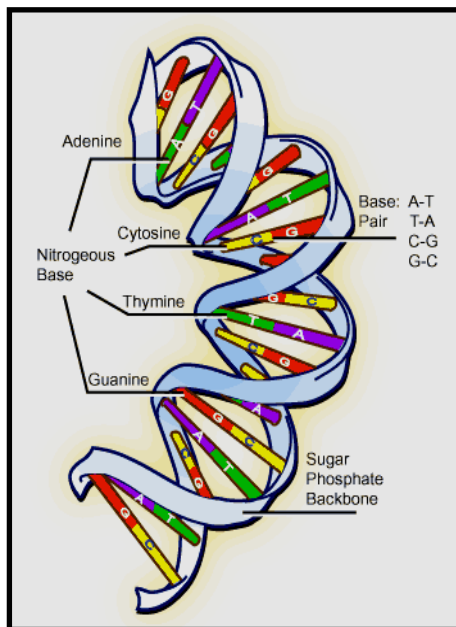
## Probenvorbereitung:



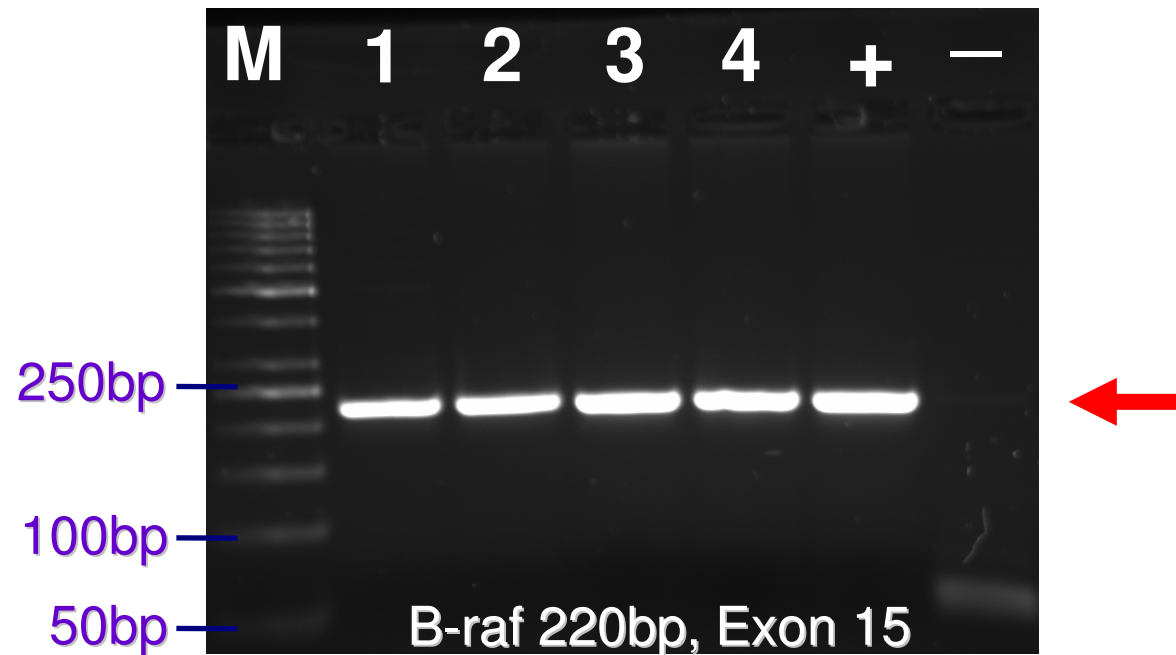
**33. MORPHOLOGIE-  
HISTOLOGIE TAGE**

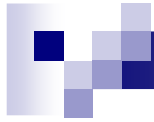
15. – 16. Oktober 2010  
Kongress Palais Kassel – Stadthalle

## DNA Isolation



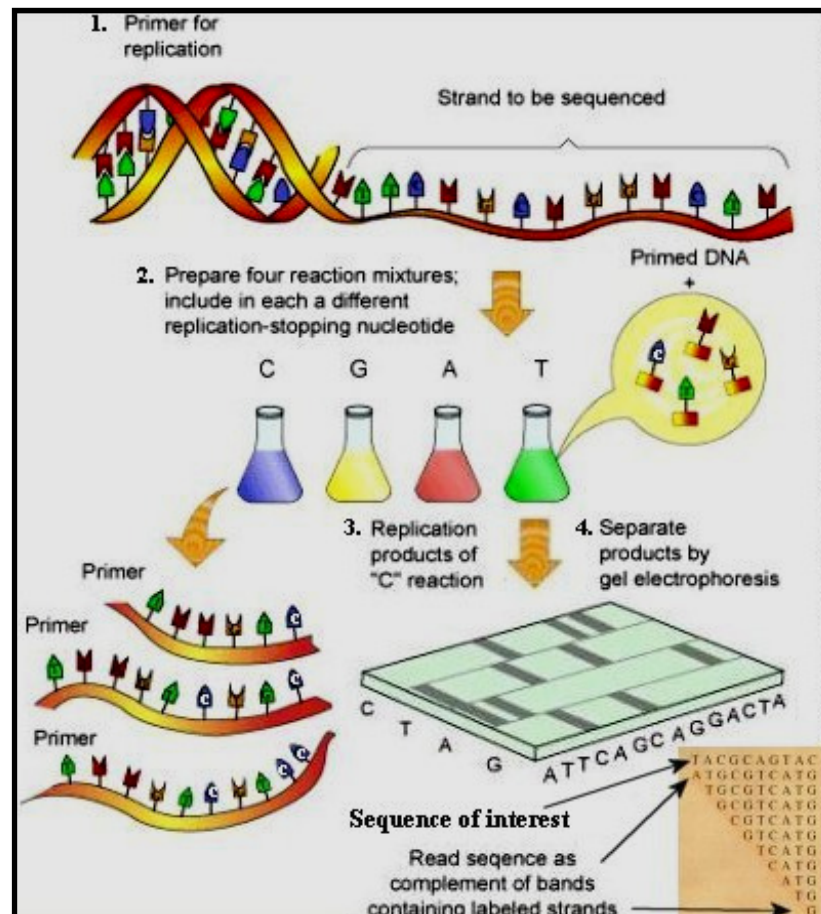
## PCR Reaktion





## Prinzip der Sequenzierung:

### Sequenzierung nach Sanger:



- fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide
- kein freies 3'OH Ende  
→ Strangabbruch
- es entstehen Produkte unterschiedlicher Größe



Prinzip der Sequenzierung:

---



**33. MORPHOLOGIE-  
HISTOLOGIE TAGE**

15. – 16. Oktober 2010  
Kongress Palais Kassel – Stadthalle

## Sequenzierung nach Sanger:

- **Aufreinigung der Produkte:**
  - **Ethanol-fällung**
  - **Gelfiltration**
- **Auftrennung der Produkte mittels  
Kapillarelektrophorese**



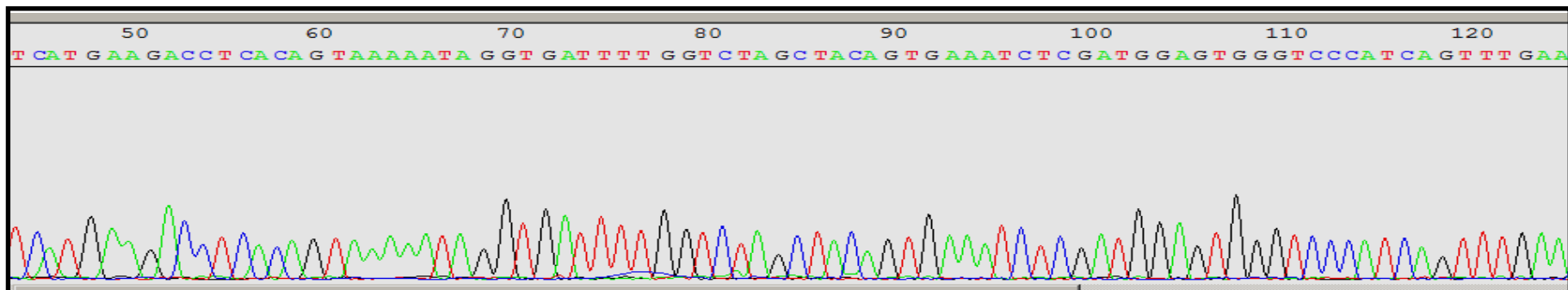
## Prinzip der Sequenzierung:

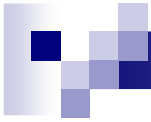


**33. MORPHOLOGIE-  
HISTOLOGIE TAGE**

15. - 16. Oktober 2010  
Kongress Palais Kassel - Stadthalle

## Kapillarelektrophorese:



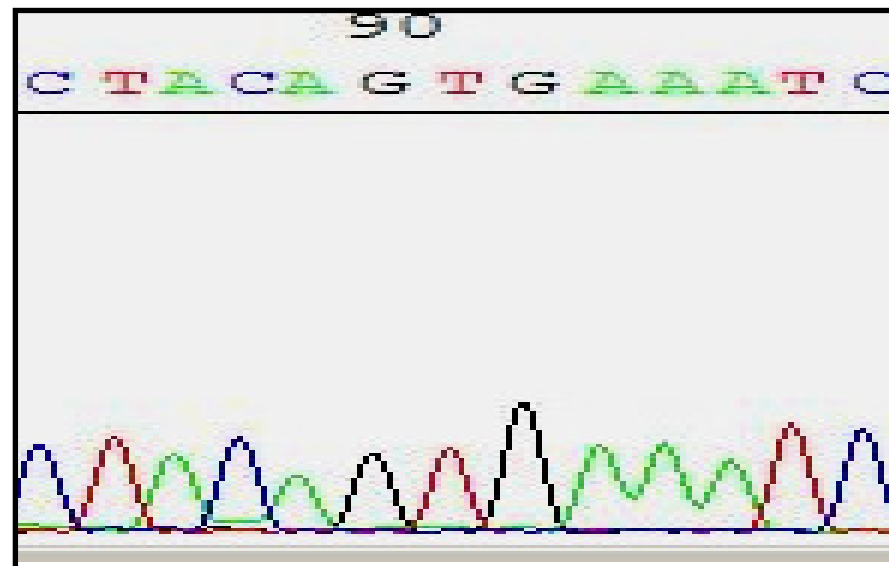
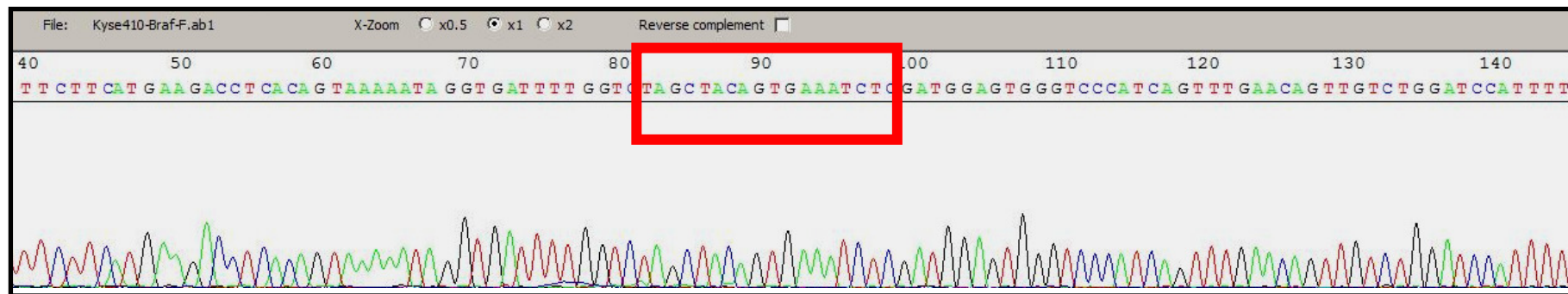


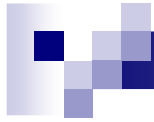
33. MORPHOLOGIE-  
HISTOLOGIE TAGE

15. – 16. Oktober 2010  
Kongress Palais Kassel – Stadthalle

## Validierung der Ergebnisse und Fehlersuche:

# B-raf Überprüfung auf V599E Mutation in Exon 15:





## Validierung der Ergebnisse und Fehlersuche:

# Sequenz Blast in der Datenbank NCBI:

```
>ref|NT_007914.15| D Homo sapiens chromosome 7 genomic contig, GRCh37 reference primary
assembly
Length=14866257

Features in this part of subject sequence:
  B-Raf

Score = 187 bits (101), Expect = 2e-45
Identities = 101/101 (100%), Gaps = 0/101 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1      ACTTACTACACCICAGATATATTTCTTCAIGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTT 60
             |||
Sbjct 1048832 ACTTACTACACCICAGATATATTTCTTCAIGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTT 1048773

Query 61      GGTCTAGTACAGTGAATCGAATGGAGTGGGICCCATCA 101
             |||
Sbjct 1048772 GGTCTAGTACAGTGAATCGAATGGAGTGGGICCCATCA 1048732
```

➤ Übereinstimmung mit B-raf Sequenz → 100%

➤ keine Mutation

TACAGTGAAT

} Wildtyp

} Sequenz

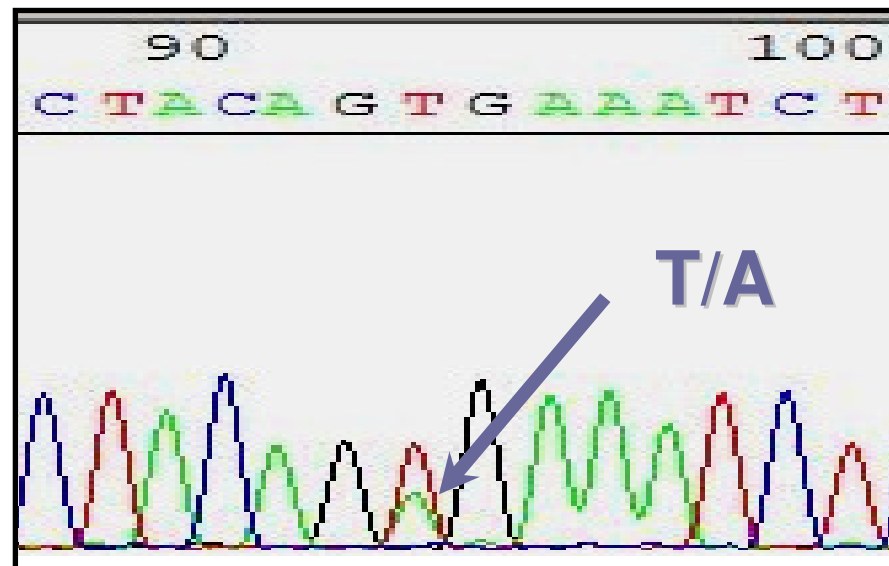
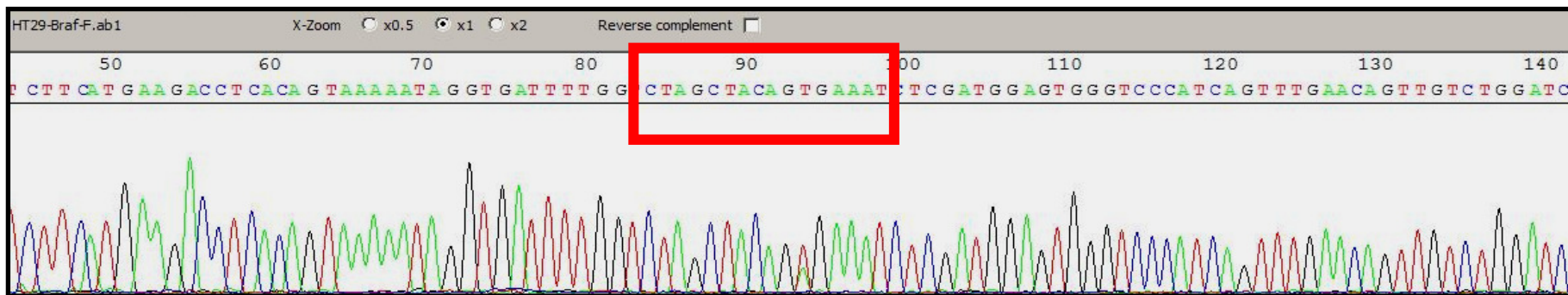


33. MORPHOLOGIE-  
HISTOLOGIE TAGE

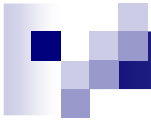
15. - 16. Oktober 2010  
Kongress Palais Kassel - Stadthalle

## Validierung der Ergebnisse und Fehlersuche:

# B-raf Überprüfung auf V599E Mutation in Exon 15:





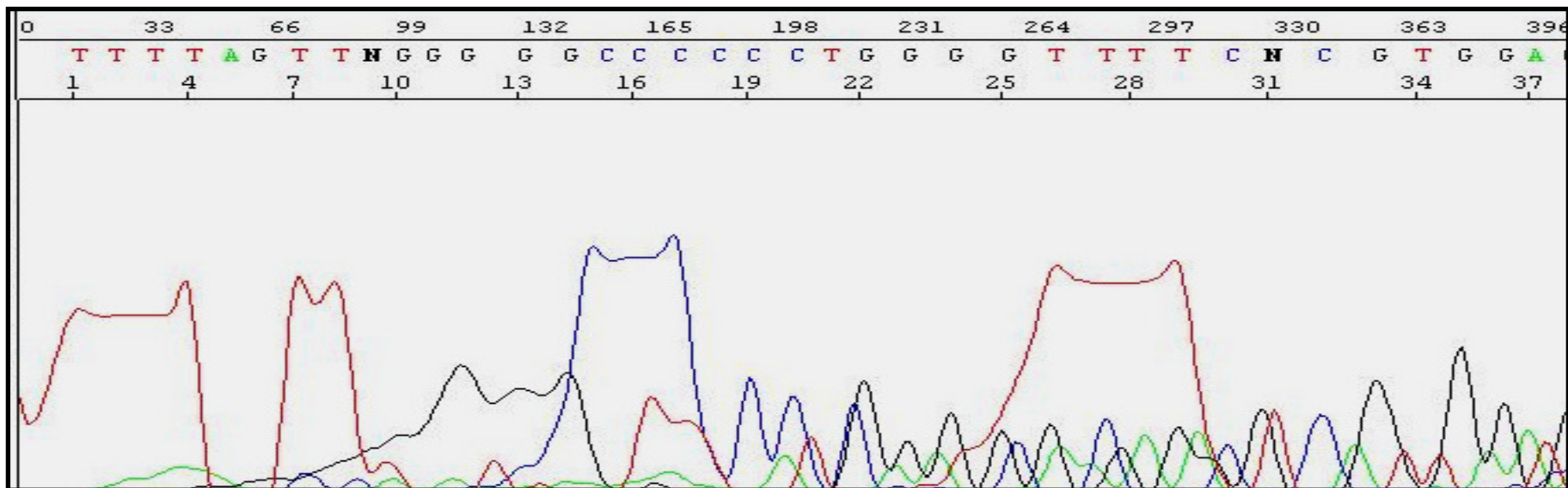


**33. MORPHOLOGIE-  
HISTOLOGIE TAGE**

15. – 16. Oktober 2010  
Kongress Palais Kassel – Stadthalle

## Validierung der Ergebnisse und Fehlersuche:

### mögliche Fehlerquellen:



- Ethanolfällung → Ethanol nicht vollständig verdampft



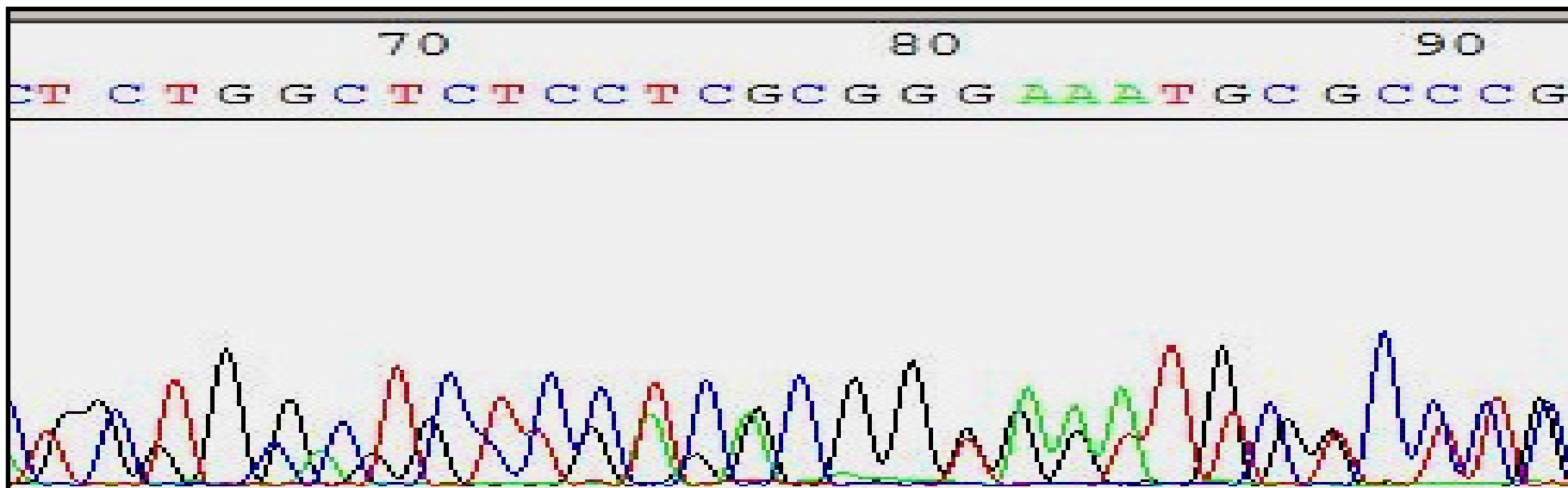
## Validierung der Ergebnisse und Fehlersuche:



**33. MORPHOLOGIE-  
HISTOLOGIE TAGE**

15. – 16. Oktober 2010  
Kongress Palais Kassel – Stadthalle

## mögliche Fehlerquellen:



- 2 Sequenzen übereinander gelagert:
  - evtl. Nebenbanden /-produkte in der PCR



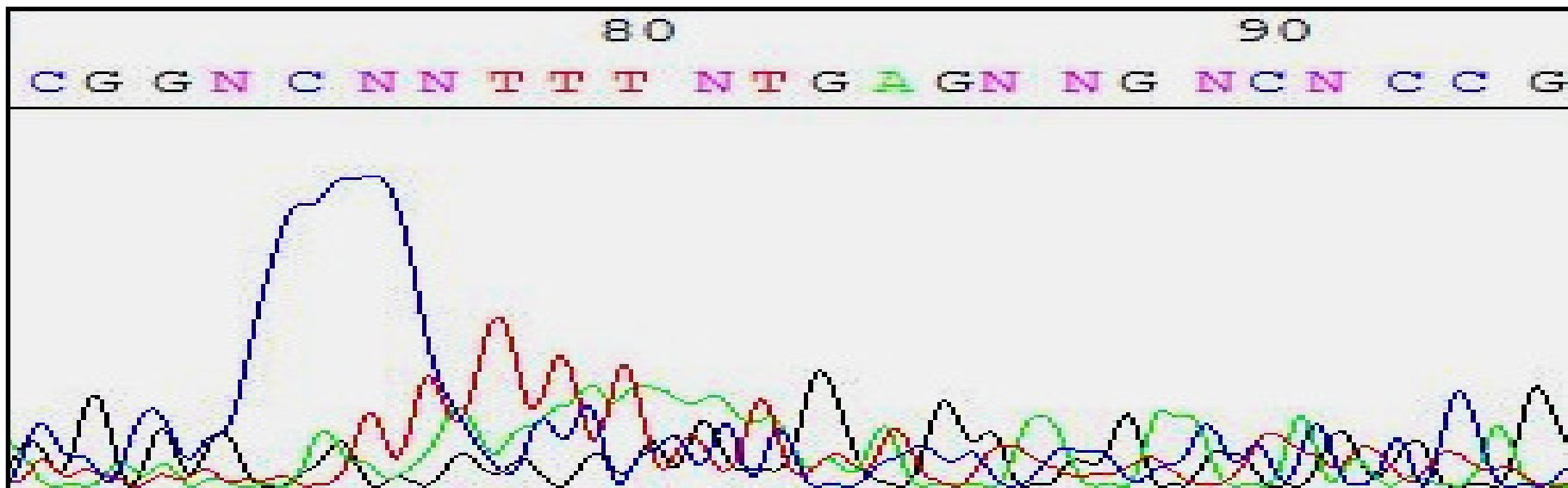
## Validierung der Ergebnisse und Fehlersuche:



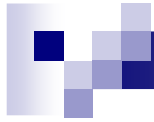
**33. MORPHOLOGIE-  
HISTOLOGIE TAGE**

15. – 16. Oktober 2010  
Kongress Palais Kassel – Stadthalle

## mögliche Fehlerquellen:



- Sequenz nicht auswertbar:
  - Kapillarelektrophorese, Polymer zu alt



## Validierung der Ergebnisse und Fehlersuche:

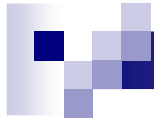


**33. MORPHOLOGIE-  
HISTOLOGIE TAGE**

15. – 16. Oktober 2010  
Kongress Palais Kassel – Stadthalle

## Tipps und Tricks:

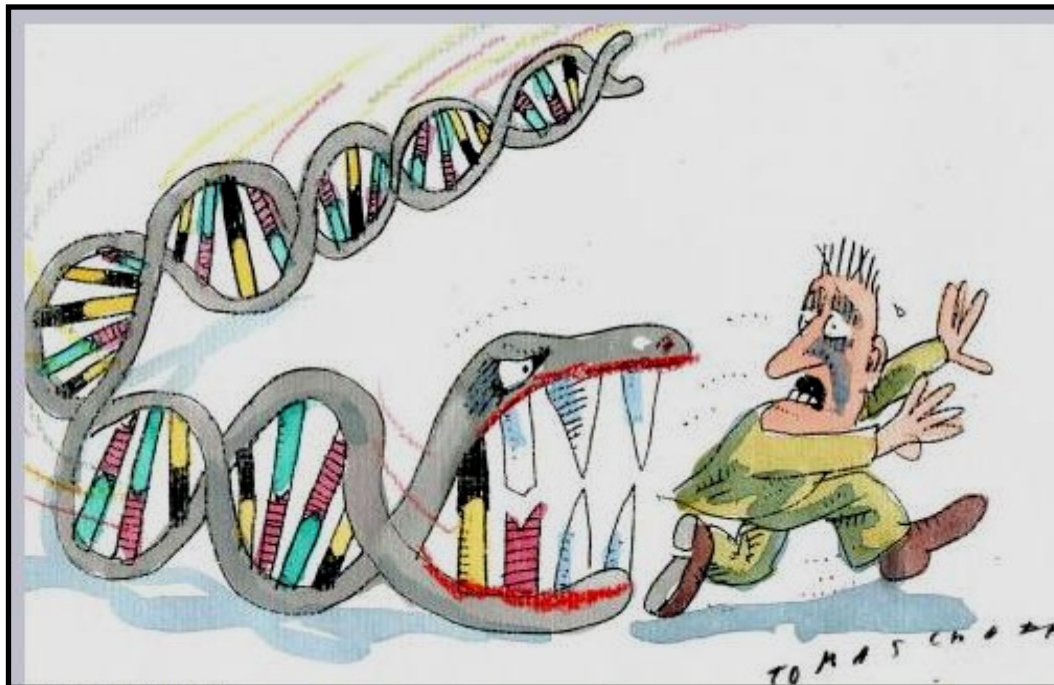
- gut etablierte PCR → keine Nebenprodukte
- richtige Lagerung der Sequenzierreagenzien
- Ethanol-fällung → keine Ethanolrückstände im aufgereinigten Produkt
- regelmäßige Wartung / Pflege der Kapillarelektrophoresegeräte
  - cave: Haltbarkeit des Polymers beachten



**33. MORPHOLOGIE-  
HISTOLOGIE TAGE**

15. - 16. Oktober 2010  
Kongress Palais Kassel - Stadthalle

# Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit!



**Fragen?**